



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 9/16, A61L 27/00, 31/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/13755 (43) Date de publication internationale: 22 juillet 1993 (22.07.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00035 (22) Date de dépôt international: 14 janvier 1993 (14.01.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/00411 16 janvier 1992 (16.01.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COLETICA [FR/FR]; 32, rue Saint-Jean-de-Dieu, F-69007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ORLY, Isabelle [FR/FR]; 9, rue Sala, F-69002 Lyon (FR). HUC, Alain [FR/FR]; 26, chemin des Santons, F-69110 Ste-Foy-les-Lyon (FR).		(74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: INJECTABLE COMPOSITION CONTAINING COLLAGEN MICROCAPSULES**(54) Titre:** COMPOSITION INJECTABLE CONTENANT DES MICROCAPSULES DE COLLAGÈNE**(57) Abstract**

A collagen-based composition including microcapsules of atelocollagen or of a mixture of atelocollagen and a polysaccharide, particularly glycosaminoglycan, suspended in a viscous biocompatible carrier solution. Together, the microcapsules and the viscous carrier solution preferably have a viscosity such that the composition may be injected, in particular as a continuous thread from a needle. Said composition is readily injectable and may be used as a soft or bony tissues filling material for, or as a system for the controlled delivery and release of biologically, cosmetically or pharmaceutically active substances.

(57) Abrégé

L'invention concerne une composition à base de collagène. Cette composition est caractérisée en ce qu'elle comprend des microcapsules d'atélcollagène ou d'un mélange d'atélcollagène et d'un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, en suspension dans une solution support biocompatible visqueuse. De préférence, l'ensemble des microcapsules et de la solution support visqueuse a une viscosité permettant l'injection de ladite composition, en particulier sous la forme d'un fil continu à la sortie d'une aiguille. La composition selon l'invention est aisément injectable et peut être utilisée comme matériau de comblement soit de tissus mous, soit de tissus osseux ou comme moyen d'introduction et de relargage contrôlé de substances actives biologique, cosmétique ou pharmaceutique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CZ	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

COMPOSITION INJECTABLE CONTENANT DES MICROCAPSULES DE COLLAGENE

05 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a essentiellement pour objet des compositions injectables contenant en suspension des microcapsules à base de collagène, leur utilisation biomédicale et des compositions pharmaceutiques.

10 La présente invention a plus précisément pour objet la réalisation d'un support injectable permettant d'obtenir des comblements de pertes de substance ou d'introduire commodément des substances actives dans l'organisme d'un être vivant, en particulier d'un être humain.

15

ETAT DE LA TECHNIQUE

Un grand nombre d'investigations ont été menées pour mettre au point des matériaux de comblement. En ce qui concerne le comblement des tissus mous, on peut citer :

- 20 - les injections de silicones, de gélatine, de collagène autologue et hétérologue
- l'implantation de fils (catgut, Gore-Tex, or, collagène)

Il se dessine clairement aujourd'hui que le matériau le plus performant en terme de biocompatibilité et de stabilité in vivo est le
25 collagène (injectable et fils) hétérologue (origine bovine).

Les applications les plus courantes des matériaux de comblement des tissus mous concernent essentiellement le traitement des dépressions cutanées et pertes de substance faciales dues à l'âge (rides), ou à d'autres causes (maladies, traumatismes, interventions chirurgicales...) et qui se traduisent par des cicatrices, atrophies, irrégularités etc...

30 Dans certains de ces cas, l'utilisation de fils de collagène réticulé telle que décrite dans le document n° 91 04518 déposé par BIOETICA est tout particulièrement indiquée compte tenu des
35 grandes qualités de biocompatibilité, de stabilité in vivo et du pouvoir de comblement élevé de ce biomatériau.

Cependant, l'utilisation de ces fils, si elle convient parfaitement au comblement des rides profondes, s'avère moins adaptée à d'autres situations (par exemple, rides superficielles, défauts cutanés ne se présentant pas sous la forme d'un sillon).

05 Dans ces cas, il est nécessaire de recourir à une forme injectable.

De plus, en dehors de la chirurgie esthétique, il existe des domaines médicaux (otorhinolaryngologie, urologie, orthopédie...)

10 pour lesquels la nature des complements à réaliser et/ou l'accessibilité des sites d'implantation nécessite impérativement l'emploi d'une forme injectable.

- Les inventions existantes les plus récentes sont décrites dans les documents EP 83868 A1 et EP 89145 A2 déposés par la société COLLAGEN CORPORATION EP 132979 A2 déposé par la société KOKEN CO.

15 LTD et US-A-3 949 073.

- Les collagènes injectables existants sont des solutions collagéniques. Dans la plupart des cas, il convient que l'implant puisse être injecté au moyen d'aiguilles fines (0,3 à 0,5 mm de diamètre en général). Pour répondre à cet impératif, les solutions doivent être relativement fluides donc peu concentrées (2 à 6,5 %). Cette limitation pose le problème de la biodégradabilité et de la tenue dans le temps de tels implants, les quantités de matières actives administrées étant relativement faibles.

20 - Pour des raisons de solubilité et de biocompatibilité, le collagène utilisé est un atélocollagène, c'est-à-dire un collagène duquel ont été éliminées les régions terminales de structure non-hélicoïdale dénommées télopeptides. Ces télopeptides sont en effet le siège de liaisons intra- et intermoléculaires de type liaisons croisées qui rendent le collagène insoluble. De plus, les télopeptides sont porteurs des principaux déterminants antigéniques du

30 collagène. Dans les produits existants, l'atélocollagène est obtenu par traitement protéasique à la pepsine qui attaque préférentiellement les télopeptides sans détruire la structure hélicoïdale. La pepsine présente cependant l'inconvénient de se fixer très fortement à son substrat et donc d'être difficilement éliminable. Or il

35

s'agit d'une molécule fortement antigénique dont la présence, même en faible quantité, risque d'altérer la biocompatibilité du produit ainsi obtenu.

05 - Pour assurer sa fonction de comblement, il convient que l'implant conserve, après l'injection, un certain volume et qu'il ne diffuse pas de façon importante dans les tissus environnants. Il constitue ainsi une sorte de matrice qui, maintenue pendant un temps suffisant, est colonisée par les tissus de l'hôte et permet une restauration de la zone traitée. Dans les produits existants, cette
10 caractéristique est satisfaite par l'utilisation de solutions d'atélocollagène qui précipitent à la température du corps, conduisant donc à la formation de fibres qui subsistent au site d'injection alors que l'excipient est progressivement résorbé (voir US-A-3 949 073).

15 Il résulte de ceci qu'avant l'injection le produit doit être impérativement conservé à basse température (inférieure à 10°C) de façon à ce qu'il conserve sa fluidité, propriété nécessaire à son administration par injection. En conséquence, les collagènes injectables basés sur ce principe nécessitent des pré-
20 cautions particulières de conservation qui en compliquent l'utilisation.

- La limitation majeure des collagènes injectables antérieurs réside dans leur résorbabilité "in vivo".

En effet, la dégradation du collagène est un processus
25 biologique normal faisant partie du métabolisme des tissus conjonctifs. Ce processus fait intervenir un certain nombre d'enzymes, en particulier les collagénases qui sont responsables de l'attaque initiale du collagène. La biodégradabilité du collagène pose un problème particulièrement important. En effet, le comblement des
30 dépressions et pertes de substance doit être un traitement définitif ou en tout cas raisonnablement durable ce qui s'accompagne mal d'une résorption rapide de l'implant.

Il existe différents traitements physiques et chimiques susceptibles de diminuer la résorbabilité en augmentant le nombre
35 de liaisons de réticulation entre les molécules de collagène. Le

glutaraldéhyde est l'agent réticulant le plus largement employé (comme décrit dans EP-A-0 089 145).

05 IL est particulièrement efficace mais présente l'incon-
vénient majeur de se polymériser en solution. Ainsi, les matériaux
réticulés par cet agent libèrent au cours du temps des monomères de
glutaraldéhyde, cytotoxiques au-delà de 10-25 ppm. Les collagènes
injectables fabriqués selon ce principe (brevet EP 89 145 A2) sont
donc en général moins dégradables que les implants non réticulés
10 (stabilité moyenne de 1 à 2 ans au lieu de 6 mois à 1 an, en ce qui
concerne les comblements de rides). En contrepartie, ils peuvent
provoquer des réactions adverses plus fréquentes ce qui suscite une
certaine méfiance et une utilisation moindre.

RESUME DE L'INVENTION

15 La présente invention a pour but principal de fournir une
solution permettant de réaliser un matériau injectable pouvant être
aisément injecté même à l'aide d'aiguille fine dont le diamètre est
de l'ordre de 0,3 à 0,5 mm, avec une teneur élevée en collagène, en
particulier d'au moins 7 % en poids/volume et de préférence aussi
20 élevé qu'environ 10 %.

La présente invention a encore pour but de résoudre le
nouveau problème technique énoncé ci-dessus en fournissant une
solution qui permette de fournir un système de vectorisation de
substances actives en permettant l'optimisation thérapeutique des
25 molécules actives, par exemple par libération dans l'organisme de
façon contrôlée, ciblage des tissus ou organes visés, et protection
de l'actif.

La présente invention a encore pour but de résoudre le
nouveau problème technique énoncé ci-dessus, en fournissant une
30 solution de meilleure biocompatibilité dont les produits de dégra-
dation ne donnent pas naissance à des résidus pouvant provoquer des
réactions indésirables.

La présente invention a encore pour but de résoudre les
nouveaux problèmes techniques énoncés ci-dessus à l'aide d'une
35 solution qui permette de moduler les vitesses de dégradation du

matériau injecté dans un être vivant, en particulier un être humain de manière à pouvoir régler la durée de vie d'un implant et également la cinétique de libération d'un actif véhiculé.

05 L'invention a aussi pour but de fournir des matériaux de comblement dont la stabilité in vivo peut être au moins égale à celle des matériaux collagéniques traités au glutaraldéhyde.

Tous ces problèmes techniques sont résolus simultanément, de manière satisfaisante, sûre, fiable et reproductible, utilisable à l'échelle industrielle et médicale, tout en étant également peu
10 coûteuse.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention fournit une composition à base de collagène, aisément injectable, caractérisée en ce qu'elle comprend des microcapsules d'atélocollagène ou d'un mélange d'atélocollagène et d'un polysaccharide,
15 en particulier un glycosaminoglycane, en suspension dans une solution support biocompatible visqueuse. De préférence, l'ensemble des microcapsules et de la solution support visqueuse a une viscosité permettant l'injection de ladite composition, en particulier sous la forme d'un fil continu à la sortie d'une aiguille.

20 Selon une variante de réalisation particulière, la solution support comprend au moins une substance protéique, par exemple de l'atélocollagène et/ou une substance polysaccharidique.

Lorsque la solution support comprend une substance protéique, celle-ci est avantageusement de l'atélocollagène, qui peut
25 être obtenu par voie enzymatique ou par voie chimique, de préférence obtenu par traitement chimique notamment à la soude, le traitement chimique étant particulièrement avantageux puisqu'il permet d'éviter toute présence résiduelle d'enzyme comme c'est le cas dans le cadre de l'utilisation d'un traitement enzymatique, habituellement la pepsine, ce qui augmente la biocompatibilité du matériau.
30 Dans les cas d'obtention d'atélocollagène par traitement enzymatique notamment à la pepsine, ou traitement chimique, notamment à la soude, il est possible de moduler le degré de déréticulation du collagène et donc la viscosité du matériau support.

35 Selon une autre variante de réalisation particulière, la substance polysaccharidique est utilisée, éventuellement en mélange

avec la substance protéique dans le matériau support, et choisie parmi le groupe consistant d'un glycosaminoglycane, d'un alginat, d'un dextran, d'une cellulose ou d'un dérivé de cellulose, d'une gomme xanthane, d'une gomme arabique, ainsi que leur(s) mélange(s).

05 Ainsi, selon une variante de réalisation avantageuse, l'atélocollagène des microcapsules est déréticulé avec un taux de déréticulation adapté à l'application souhaitée.

 Comme polysaccharide qui peut être utilisé en mélange avec l'atélocollagène pour la préparation des microcapsules pré-
10 citées, on peut utiliser en particulier un glycosaminoglycane choisi parmi le groupe consistant des glycosaminoglycannes de structure choisis parmi le chondroïtine-4-sulfate, le chondroïtine-6-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate, le kératane-sulfate, ainsi que l'héparine et ses dérivés, en particulier les
15 hérapines de bas poids moléculaire ayant un poids moléculaire compris entre environ 2 000 et environ 10 000 ; et un polyholoside, et en particulier le dextran.

 Le procédé de préparation des microcapsules est basé sur celui décrit dans un brevet antérieur du déposant FR-A-2 642 329
20 qui est incorporé ici par référence.

 Il est avantageux que la proportion de polysaccharide relativement à l'atélocollagène soit comprise entre 10 et 70 %, mieux entre 15 et 50 % en poids.

 Dans le cadre de la préparation des microcapsules, on
25 réalise une réticulation de l'atélocollagène et éventuellement des polysaccharides par réticulation interfaciale en réalisant une émulsion de la solution d'atélocollagène et de polysaccharides comme phase dispersée dans un liquide hydrophobe formant la phase continue, dans lequel l'atélocollagène et/ou les polysaccharides
30 sont essentiellement insolubles.

 Pour la réticulation, on ajoute à l'émulsion de la solution d'atélocollagène et éventuellement des polysaccharides, un agent réticulant comportant des groupes réactifs capables de réagir avec les groupes acylables de l'atélocollagène et des polysaccharides de manière à réaliser une réaction de réticulation interfa-
35

05 ciale. Comme agent réticulant préféré, on utilise un dichlorure d'acide ou un anhydride d'acide ou un acide carboxylique di- ou poly-basique. Comme agents réticulants préférés, on utilise le chlorure de téréphtaloyle, le chlorure d'acide phtalique, le chlorure d'acide sébacique, le chlorure d'acide succinique, le chlorure d'un acide tricarboxylique comme l'acide citrique ou un anhydride d'acide comme l'anhydride succinique.

10 Comme liquide hydrophobe, dans lequel l'atélocollagène et/ou les polysaccharides sont insolubles, on utilise de préférence des esters d'acide gras, de préférence choisis parmi ceux habituellement administrables par voie parentérale tels que triglycérides, oléate d'éthyle ; ou dépourvus de propriétés toxiques, tels que le myristate d'isopropyle, le cocoate d'éthyle 2-hexyle.

15 La concentration en polysaccharides dans la solution de polysaccharides est avantageusement comprise entre 0,5 et 4 %, encore mieux entre 0,5 et 2 %, et encore de préférence est voisine de 1 %.

20 La solution d'atélocollagène pour la préparation des microcapsules est une solution aqueuse d'atélocollagène ayant une concentration comprise entre 0,5 et 2 % en poids.

Pour la préparation des microcapsules, l'atélocollagène peut avoir été obtenu par digestion enzymatique de collagène, notamment à la pepsine, ou encore par traitement chimique à la soude.

25 Pour le procédé de préparation proprement dit des microcapsules, on se reportera au document FR-A-2 642 329 qui est incorporé ici par référence, et en particulier aux exemples 1 à 6.

30 Selon un mode de réalisation avantageux, la dimension des microcapsules est inférieure ou égale à environ 500 μm . Dans certains cas, la dimension des microcapsules est inférieure à 250 μm et peut être même comprise entre 20 et 50 μm , en particulier dans le cas où l'on désire injecter la composition par une aiguille fine ayant un diamètre comprise entre 0,3 et 0,5 mm.

35 Selon une variante particulière, la proportion relative des microcapsules par rapport à la solution support biocompatible visqueuse est comprise entre 0,5-15/99,5-85 en poids/volume.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, les microcapsules contiennent au moins une substance active, soit encapsulée à l'intérieur, soit dans la masse des parois des microcapsules, soit greffée en surface interne et/ou externe. Cette substance active peut être biologiquement active, cosmétiquement ou pharmaceutiquement active. Par substance biologiquement active, on entend une substance qui a un effet biologique sur l'organisme qui n'est pas nécessairement cosmétique ou thérapeutique. Une substance active actuellement préférée est l'hydroxyapatite, en particulier sous forme de particules, par exemple de taille égale à environ 50 μm .

Selon un deuxième aspect, la présente invention fournit également une utilisation de la composition précitée comme agent vecteur de substance biologiquement, cosmétiquement ou pharmaceutiquement active.

La présente invention couvre aussi une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition à base de collagène aisément injectable telle que précédemment définie.

L'invention couvre enfin un implant, caractérisé en ce qu'il a été préparé à partir d'une composition injectable précédemment définie.

D'autre part, l'invention couvre également des réalisations particulières de compositions. Comme réalisations particulières, on préfère une réalisation selon laquelle les microcapsules sont à base d'atélocollagène éventuellement mélangé avec un glycosaminoglycane comme le chondroïtine-4-sulfate, ces microcapsules contenant des granules d'hydroxyapatite en suspension dans une solution support biocompatible visqueuse d'un gel d'atélocollagène éventuellement mélangé avec un glycosaminoglycane, en particulier le chondroïtine-4-sulfate. Lorsque les granules d'hydroxyapatite ont une dimension d'environ 50 μm , les microcapsules ont une dimension de l'ordre de 200 μm .

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la solution support biocompatible visqueuse est adaptée aux condi-

tions physiologiques de pH et de pression osmotique, et en ayant de préférence un pH compris entre 6,8 et 7,5 et une pression osmotique comprise entre 260 et 320 mOsm/l H₂O. On peut obtenir un tel pH et une telle osmolarité de la solution support en ajustant avec un
05 tampon phosphate comprenant par exemple un mélange de phosphates, de sodium et/ou de potassium mono- et disodiques, ou d'un mélange tampon phosphate et chlorure de sodium pour compléter la solution support de suspension des microcapsules.

Grâce à la nature des constituants des microcapsules,
10 atélocollagène éventuellement mélangé à des polysaccharides, les microcapsules sont souples, déformables, de sorte qu'en suspension dans la solution support biocompatible visqueuse selon l'invention, la composition possède dans son ensemble des propriétés d'écoulement telles qu'on peut injecter aisément au moyen d'une aiguille
15 fine ayant un diamètre de 0,3 à 0,5 µm, un matériau contenant jusqu'à 10 % de collagène en poids/volume. Cette possibilité représente une augmentation de 35 % par rapport aux produits antérieurs les plus concentrés (6,5 %).

Ainsi, les compositions selon l'invention sont particu-
20 lièrement appropriées pour être utilisées comme matériaux de comblements, soit pour réaliser des comblements de tissus mous, ou des comblements osseux pour la reconstruction osseuse. Dans ces applications, il est évident que toute augmentation de la concentration en substance active augmente de facto la durée de vie de l'implant
25 et l'efficacité du comblement.

La composition selon l'invention conjugue ainsi les propriétés biologiques du collagène, sous sa forme atélocollagène, à celles des autres substances éventuellement mises en oeuvre (poly-
30 saccharides co-réticulés avec l'atélocollagène, substances actives en solution ou en suspension dans les sphères, molécules greffées à leur surface).

Ainsi, les compositions selon l'invention possèdent un vaste champ d'application en tant que système de vectorisation de substances actives. Cette forme galénique est particulièrement
35 intéressante puisqu'elle permet, selon les utilisations :

- l'optimisation thérapeutique de molécules actives par libération dans l'organisme de façon contrôlée, ciblage des tissus ou organes visés, protection de l'actif ;

05 - l'accès par voie percutanée à des sites habituellement accessibles uniquement par voie chirurgicale (site osseux par exemple), ce qui limite le traumatisme subi par le patient et les coûts et durée d'hospitalisation.

10 Il est bien entendu que l'on peut également envisager un certain nombre d'applications dans lesquelles peuvent être mises à profit à la fois la fonction de comblement et l'utilisation d'une forme galénique particulièrement avantageuse.

15 La composition selon l'invention est particulièrement adaptée à l'utilisation en tant que vecteur dans la mesure où sa dégradation ne donne pas naissance à des résidus pouvant provoquer des réactions indésirables. Ceci constitue un avantage majeur par rapport à certains polymères synthétiques de la technique antérieure.

20 La dégradation des microcapsules peut être modulée dans de très larges limites d'une part par un degré de déréticulation variable de l'atélocollagène par voie chimique ou enzymatique ; et d'autre part en réglant le taux de réticulation interfaciale. On peut ainsi régler la vitesse de résorbabilité depuis une vitesse rapide à une stabilité supérieure à celle obtenue avec des matériaux réticulés au glutaraldéhyde, tout en évitant les incon-

25 vénients liés à la toxicité de cet agent.

On multiplie ainsi le champ d'application des compositions selon l'invention, en jouant sur la durée de vie de la composition, en particulier sous forme d'implant, selon qu'elle est destinée à subsister le plus longtemps possible au niveau du site

30 d'implantation ou être résorbée et remplacée plus ou moins rapidement par les tissus de l'hôte ; et la cinétique de libération de l'actif.

On comprend ainsi que la présente invention fournit une solution technique présentant des avantages techniques déterminant

35 par rapport à l'état de la technique antérieure.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de la présente invention donnée simplement à titre d'illustration et qui ne saurait en aucune façon limiter la portée de l'invention. Les exemples font cependant partie intégrante de l'invention et l'homme de l'art appréciera à leur lecture, les caractéristiques nouvelles générales qui en résultent.

Dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

Exemple 1 : Suspension de microcapsules d'atélocollagène de 20 à 50 µm dans un gel d'atélocollagène

Cette suspension constitue un produit destiné à assurer une fonction de comblement, des tissus mous en particulier.

a) Préparation de l'atélocollagène par traitement à la pepsine

La peau de veau fraîchement abattu est soumise à épilation chimique dans un bain contenant 3 % de sulfure de sodium et 4 % de chaux, la proportion étant de 100 g de peau pour 200 ml de solution. Le derme est alors isolé du reste de la peau par une opération de refendage grâce à une scie tournante à ruban.

Le tissu obtenu est broyé et extrudé à fravers une grille comportant des trous de 4 mm.

Le broyat est dispersé dans une solution d'acide acétique 0,5 M contenant la pepsine dans les proportions de 1 g d'enzyme pour 10 g de collagène sec, le pH du mélange étant ajusté si nécessaire pour obtenir un pH compris entre 2 et 3. Après agitation, le mélange est laissé en incubation pendant 36 h à 10°C. Après filtration, le collagène est précipité par addition de NaCl 0,7 M. Après agitation et incubation (4 h), les fibres précipitées sont récupérées par centrifugation (14 000 tr/min). Le surnageant est éliminé et la pepsine est inactivée par dispersion du culot dans un tampon Tris 0,05 M - NaCl 0,15 M dont le pH est ajusté, après dispersion des fibres, à 8,5. Après 3 jours d'incubation à 10°C, la dispersion est dialysée contre de l'eau désionisée et stérile à

L'aide de membranes de dialyse, de préférence formées par des boyaux dont le seuil de coupure est compris entre 6 000 et 8 000 daltons.

05 b) Préparation de la solution d'atélocollagène en milieu tamponné à pH 8-8,2

L'atélocollagène provenant des boyaux de dialyse est diluée par une solution de bicarbonate de sodium de volume et de concentration tels que les concentrations finales soient les suivantes :

- 10
- Atélocollagène..... 1 %
 - Bicarbonate de sodium anhydre..... 4 %

15 Il est vérifié que le pH de la solution obtenue est bien compris entre 8 et 8,2. On prépare 1 kg de cette solution.

c) Préparation de l'agent de réticulation

20 100 g de chlorure de téréphtaloyle sont ajoutés à 4 l d'un solvant hydrophobe, préférentiellement des esters d'acides gras choisis parmi ceux habituellement administrables par voie parentérale (triglycérides, oléate d'éthyle par exemple) ou dépourvus de propriétés toxiques (myristate d'isopropyle, cocoate d'éthyle-2-hexyle par exemple). L'ensemble est agité par agitation mécanique.

25

d) Emulsification

30 3 l du solvant hydrophobe choisi selon les critères cités au-dessus sont introduits dans un récipient. La solution d'atélocollagène tamponnée préparée précédemment est ajoutée sous agitation à l'Ultra Turax (R) tournant à 7 200 tr/min.

e) Réticulation

La solution d'agent réticulant est ajoutée à l'émulsion obtenue. L'agitation est maintenue pendant 30 min.

35

On obtient ainsi des microcapsules.

f) Lavages

Trois lavages sont effectués par 10 l du solvant hydrophobe et les microcapsules sont recueillies par décantation à l'aide d'une décanteuse Robatel tournant à 1 000 tr/min.

05 Cinq à huit lavages à l'éthanol (15 à 20 l au total) sont effectués de la même façon, suivis de trois à cinq lavages à l'eau désionisée et stérile.

g) Lyophilisation

10 On procède à une lyophilisation de manière classique du produit lavé contenant les microcapsules.

h) Stérilisation

15 Après conditionnement des sphères sèches sous emballage scellé, les microcapsules sont stérilisées par exposition au rayonnement gamma (25 kGy).

i) Préparation du milieu de suspension

20 L'atélocollagène est déréticulé par traitement à la soude dans les conditions exposées ci-dessous.

Après épilation, refendage et broyage des peaux tels que décrits en a), le broyat est soumis à deux lavages au tampon phosphate pH 7,8 (21,7 g/l de Na_2HPO_4 et 0,78 g/L de KH_2PO_4) puis à deux lavages à l'eau désionisée et stérile.

25 Le broyat est alors mis en contact pendant huit jours avec une solution de soude à raison de 1 kg de broyat pour 4 l de solution de concentration telle que la quantité finale de soude soit de 8 % (p/v). A l'issue de ce traitement, l'atélocollagène est précipité par addition d'acide chlorydrique concentré jusqu'à
30 l'obtention d'un pH compris entre 2 et 2,5. La suspension obtenue est introduite dans des boudins de dialyse (seuil de coupure compris entre 6 000 et 8 000 daltons) et dialysée contre de l'eau stérile et désionisée.

35 L'atélocollagène obtenu est ensuite lyophilisé, stérilisé par rayonnement gamma et mis en solution dans des conditions sté-

05 riles. Le pH et l'osmolarité de la solution sont ajustés par utilisation d'un tampon phosphate (mélange de phosphates de sodium et/ ou de potassium mono- et disodique) ou d'un mélange tampon phosphate et chlorure de sodium de façon à obtenir un pH compris entre 6,8 et 7,5 et une pression osmotique comprise entre 260 et 320 mOsm/l H₂O.

Exemple de composition du milieu de suspension :

- 10
- Atélocollagène.....1 %
 - Na₂HPO₄.....0,02 M
 - NaCl.....0,13 M
 - pH 7,3

j) Mise en suspension

15 Les microcapsules sont mises en suspensions dans le milieu de suspension d'atélocollagène obtenu à l'étape i) dans des conditions stériles à raison de 100 mg de sphères sèches par ml de milieu de suspension. La suspension est agitée de façon à obtenir un mélange parfaitement homogène. Le pH du mélange est vérifié.

20

k) Préparation des seringues

Le mélange est introduit dans des conditions stériles, dans des seringues de 1 ml munies d'un embout de type luer-lock et d'aiguilles de diamètre de 0,3 à 0,5 mm.

25

l) Evaluation du produit obtenu

* Stabilité thermique par analyse en Calorimétrie Différentielle Programmée :

30 Les paramètres enregistrés sur les microcapsules après lyophilisation sont les suivants :

- température de début de dénaturation : 65°C
- température de pic de dénaturation : 72,6°C
- température de fin de dénaturation : 80°C

35 Ces valeurs sont particulièrement élevées et sont du même ordre de grandeur qu'avec les produits obtenus par réticulation au glutaraldéhyde par exemple.

* Evaluation in vivo :

Les essais ont été réalisés sur des rats Wistar femelles de 180 à 200 g.

05 Le matériau est implanté sur le dos des rats, en position sous-cutanée. Chaque site d'implantation (2 par rat) reçoit environ 0,1 ml de la suspension.

Les biopsies et les contrôles histologiques effectués après 1 et 7 jours d'implantation montrent :

- un pouvoir de comblement important
- 10 - une parfaite biocompatibilité
- une absence totale de dégradation de l'implant.

Ces résultats assurent à l'implant une stabilité à long terme particulièrement élevée.

15 EXEMPLE 2 : Suspension de microcapsules d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate de 200 µm environ contenant des granules d'hydroxyapatite dans un gel d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate

20 Dans cet exemple, des granules d'hydroxyapatite (minéral de composition chimique proche du minéral osseux et utilisé pour les reconstructions osseuses) sont incorporés dans des microcapsules. Ce système permet de véhiculer les granules d'hydroxyapatite et les rend injectables à travers un trocard. Elles pourront ainsi être implantées en site osseux par voie percutanée.

25

a) Préparation de l'atélocollagène par traitement à la soude

Cette étape est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'exemple 1, paragraphe i).

30 b) Préparation de la chondroïtine-4-sulfate

Des cloisons nasales d'agneau débarrassées des tissus musculaires et adipeux sont hachés et broyés par extrusion à travers une grille comportant des trous de 4 mm ; le broyat est placé pendant 24 heures à une température de 6°C dans un tampon de chlorure de potassium (11,8 g/l de KCl ; 78,8 mg/l de cystéine,

35

180 mg/l d'EDTA) renfermant 1 % de papaine "MERCK". La proportion étant de 130 g de broyat pour 1 l de tampon.

05 Le surnageant est séparé du culot par centrifugation en continu à l'aide d'une décanteuse tournant à 4 000 tr/min. Au surnageant sont alors ajoutés 40 g/l d'acide trichloracétique. Le précipité est éliminé par centrifugation en continu selon la technique précédente. Le surnageant est neutralisé à l'aide de soude en pastilles. Le mélange est alors dialysé contre de l'eau désionisée et stérile à l'aide de boyaux dont le seuil de coupure est compris
10 entre 6 et 8 000 daltons. La solution dialysée est lyophilisée. La chondroïtine-4-sulfate est obtenue à l'état sec.

c) Préparation de la solution d'atélocollagène et de chondroïtine-4-sulfate dans un milieu tamponné à pH 8,9

15 L'atélocollagène sous forme de fibres provenant des boyaux de dialyse est dilué par une solution contenant du chondroïtine-4-sulfate et du carbonate de sodium de volume et de concentration tels que les concentrations finales soient les suivantes :

- 20 - Atélocollagène : 1,6 %
- Chondroïtine-4-sulfate : 0,6 %
- Carbonate de sodium anhydre : 4,8 %

Le pH de l'ensemble est ajusté à 8,9 par l'acide chlorhydrique concentré.

25 On prépare 1 kg de cette solution.

d) Incorporation de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite sous forme de granules sphériques de 50 µm de diamètre environ est incorporée dans la préparation précédemment décrite à raison de 5 % (p/v).
30

e) Préparation de l'agent de réticulation

180 g de chlorure de téréphtaloyle sont ajoutés à 4 l de myristate d'isopropyle. L'ensemble est agité par agitation mécanique.
35

f) Emulsification

150 ml de Span 85 (ICI Company) sont mélangés à 3 l de myristate d'isopropyle. Dans le mélange agité mécaniquement est versée la solution collagénique contenant l'hydroxyapatite. L'ensemble est agité quelques minutes pour obtenir l'émulsion.

g) Réticulation

La solution d'agent réticulant est ajoutée à l'émulsion obtenue. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes.

On obtient ainsi les microcapsules contenant les granulés d'hydroxyapatite.

h) Lavages

Les microcapsules sont lavées dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 1.

i) Préparation du milieu de suspension

L'atélocollagène provenant des boyaux de dialyse est dilué par une solution de chondroïtine-4-sulfate de volume et de concentration tels que les concentrations finales soient les suivantes :

- Atélocollagène.....0,8 %
- Chondroïtine-4-sulfate.....0,2 %

Le mélange est amené à pH 8.

j) Mise en suspension des microcapsules

Les microcapsules sont mises en suspension dans le milieu décrit ci-dessus dans des proportions telles que dans le mélange final 90 % de l'ensemble atélocollagène - chondroïtine-4-sulfate provienne des microcapsules et 10 % provienne du milieu de suspension.

On obtient ainsi une composition selon l'invention qui peut être utilisée telle quelle ou être traitée comme décrit ci-après.

k) Lyophilisation

On lyophilise la composition obtenue à l'étape j de manière classique.

05 l) Stérilisation

Mêmes conditions que l'exemple 1.

m) Réhydratation en milieu tamponné

10 Le lyophilisat est mis en suspension dans des conditions stériles à raison de 500 mg de lyophilisat par ml de tampon phosphate 0,1 M. Le pH du tampon phosphate est fixé de façon à ce que le pH du mélange soit compris entre 7 et 7,3.

n) Préparation des seringues

15 Le mélange est introduit, dans des conditions stériles, dans des seringues de 5 ml munies d'aiguilles de 1,5 mm de diamètre.

REVENDICATIONS

05 1. Composition à base de collagène, aisément injectable, caractérisée en ce qu'elle comprend des microcapsules d'atélocollagène ou d'un mélange d'atélocollagène et d'un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, en suspension dans une solution support biocompatible visqueuse, de préférence l'ensemble des microcapsules et de la solution support visqueuse ayant une viscosité permettant l'injection de ladite composition, en particulier
10 sous la forme d'un fil continu à la sortie d'une aiguille.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution support comprend au moins une substance protéique par exemple l'atélocollagène, et/ou une substance polysaccharidique.

15 3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la solution support comprend une substance protéique choisie parmi l'atélocollagène obtenu de préférence par traitement chimique notamment à la soude.

20 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'atélocollagène des microcapsules est déréticulé avec un taux de déréticulation adapté à l'application souhaitée.

25 5. Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la substance polysaccharidique de la solution support est choisie parmi un glycosaminoglycane, un alginate, un dextran, une cellulose ou un dérivé de cellulose, une gomme xanthane, une gomme arabique et leur(s) mélange(s).

30 6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les microcapsules sont réalisées à partir d'atélocollagène ou d'un mélange d'atélocollagène et de polysaccharide réticulés, le polysaccharide étant de préférence choisi parmi un glycosaminoglycane de structure choisi parmi le groupe consistant de chondroïtine-4-sulfate, de chondroïtine-6-sulfate, de dermatane-sulfate, d'héparane-sulfate, de kératane-sulfate,
35 ainsi que d'héparine et ses dérivés en particulier des héparines de bas poids moléculaire ayant un poids moléculaire compris entre

environ 2 000 et environ 10 000, et un polyholoside, en particulier le dextran.

05 7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la proportion relative en poids/volume des microcapsules par rapport à la solution support est comprise entre 0,5 et 15 % en poids de microcapsules par rapport au volume de la solution support.

10 8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la proportion en poids dans les microcapsules de polysacharrides par rapport à l'atélocollagène est comprise entre 10 et 70 %.

15 9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les microcapsules contiennent au moins une substance active, soit encapsulée à l'intérieur des microcapsules, soit dans la masse des parois, soit greffée en surface interne et/ou externe, cette substance active étant de préférence une substance biologiquement, cosmétiquement ou pharmaceutiquement active.

20 10. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la dimension des microcapsules est inférieure à environ 500 µm.

25 11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les microcapsules sont réalisées à partir d'atélocollagène ou d'un mélange d'atélocollagène et d'un glycosaminoglycane, en particulier du chondroïtine-4-sulfate, et contiennent des granules d'hydroxyapatite ; et la solution support est réalisée à partir d'un gel d'atélocollagène éventuellement mélangé avec un glycosaminoglycane, en particulier le chondroïtine-4-sulfate.

30 12. Utilisation de la composition telle que définie selon l'une quelconques des revendications 1 à 11, comme agent vecteur de substance active, en particulier de substance biologiquement, cosmétiquement ou pharmaceutiquement active.

35 13. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, comme matériau de comblement, en particulier de tissus mous ou de tissus osseux, en particulier avec une

stabilité in vivo au moins égale à celle des matériaux collagéniques traités au glutaraldéhyde.

05 14. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition à base de collagène telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 11.

15. Matériau de comblement, caractérisé en ce qu'il a été préparé à partir d'une composition à base de collagène, telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 11.

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 A61K9/16; A61L27/00; A61L31/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

A61K ; A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	EP,A,0 381 543 (BIOETICA) 8 Août 1990 cité dans la demande ---	
A	EP,A,0 397 542 (BIOETICA) 14 Novembre 1990 ---	
A	EP,A,0 230 647 (SUMITOMO) 5 Août 1987 ---	
A	EP,A,0 196 197 (COLLAGEN) 1 Octobre 1986 -----	

⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.^{"A"} document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

03 MAI 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

PELTRE CHR.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00035

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.5 A61K9/16; A61L27/00; A61L31/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 A61K; A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 381 543 BIOETICA) 8 August 1990 cited in the application	
A	EP,A,0 397 542 (BIOETICA) 14 November 1990	
A	EP,A,0 230 647 (SUMITOMO) 5 August 1987	
A	EP,A,0 196 197 (COLLAGEN) 1 October 1986	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 May 1993 (03.05.93)

Date of mailing of the international search report

21 May 1993 (21.05.93)

Name and mailing address of the ISA

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer:

Facsimile No

Telephone No

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300035
SA 69935

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 03/05/93.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

03/05/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0381543	08-08-90	FR-A- 2642329	03-08-90
		AU-B- 633866	11-02-93
		AU-A- 4886490	09-08-90
		JP-A- 2229111	11-09-90
EP-A-0397542	14-11-90	FR-A- 2645455	12-10-90
		DE-U- 6900019	20-08-92
		JP-A- 3065236	20-03-91
EP-A-0230647	05-08-87	JP-A- 62152816	07-07-87
		US-A- 4849141	18-07-89
		JP-A- 62228028	06-10-87
EP-A-0196197	01-10-86	US-A- 4642117	10-02-87
		AU-B- 581588	23-02-89
		AU-A- 5502286	25-09-86
		CA-A- 1254137	16-05-89
		JP-B- 4002059	16-01-92
		JP-A- 61226052	07-10-86

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300035
SA 69935

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

03/05/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0381543	08-08-90	FR-A- 2642329	03-08-90
		AU-B- 633866	11-02-93
		AU-A- 4886490	09-08-90
		JP-A- 2229111	11-09-90
EP-A-0397542	14-11-90	FR-A- 2645455	12-10-90
		DE-U- 6900019	20-08-92
		JP-A- 3065236	20-03-91
EP-A-0230647	05-08-87	JP-A- 62152816	07-07-87
		US-A- 4849141	18-07-89
		JP-A- 62228028	06-10-87
EP-A-0196197	01-10-86	US-A- 4642117	10-02-87
		AU-B- 581588	23-02-89
		AU-A- 5502286	25-09-86
		CA-A- 1254137	16-05-89
		JP-B- 4002059	16-01-92
		JP-A- 61226052	07-10-86

THIS PAGE BLANK (..